

ANNÉE 1925

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

André GIBERTON

né à Paris le 30 Juin 1899

Ancien Externe des Hôpitaux

Contribution à l'étude chimique et biologique de quelques sucres

Président : M. DESGREZ, Professeur



1925

LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE

49, Boulevard St-Michel, 49

PARIS

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

LE DOYEN.....	M. ROGER
PROFESSEURS	MM.
Anatomie.....	NICOLAS
Anatomie médico-chirurgicale.....	CUNEO
Physiologie.....	Ch. RICHET
Physique médicale.....	STROHL
Chimie organique et chimie générale.....	DESGREZ
Bactériologie.....	BESANCON
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	BRUMPT
Pathologie et thérapeutique générales.....	Marcel LABBÉ
Pathologie médicale.....	LECENE
Pathologie chirurgicale.....	LETULLE
Anatomie pathologique.....	PRENANT
Histologie.....	RICHAUD
Pharmacologie et matière médicale.....	CARNOT
Thérapeutique.....	BERNARD
Hygiène.....	BALTHAZARD
Médecine légale.....	MENETRIER
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	ROGER
Pathologie expérimentale et comparée.....	ACHARD
Clinique médicale.....	WIDAL
	GILBERT
	CHAUFFARD
Hygiène et clinique de la première enfance.....	MARFAN
Clinique des maladies des enfants.....	NOBECOURT
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.....	CLAUDE
Cliniques des maladies cutanées et syphilitiques..	JEANSELME
Clinique des maladies du système nerveux.....	GUILLAIN
Clinique des maladies contagieuses.....	TEISSIER
Clinique chirurgicale.....	DELBET
	LEJARS
	HARTMANN
	GOSSET
Clinique ophtalmologique.....	De LAPERSONNE
Clinique des Maladies des voies urinaires.....	LEGUEU
Clinique d'accouchements.....	BRINDEAU
	COUVELAIRE
	JEANNIN
Clinique gynécologique.....	J.-L. FAURE
Clinique chirurgicale infantile.....	OMBREDANNE
Clinique thérapeutique.....	VAQUEZ
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	SEBILLEAU
Clinique thérapeutique chirurgicale.....	DUVAL
Clinique propédeutique.....	SERGENT

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.	MM.	MM.	MM.
ABRAMI	DUVOIR	LEMIERRE	RICHET
ALGLAVE	FISSINGER	LEQUEUX	RIBIERRE
BASSET	GARNIER	LEREBoullet	RICHAUD
BAUDOUIN	GOUGEROT	LERI	ROUSSY
BINET	GREGOIRE	LEVY-SOLAI	ROUVIERE
BLANCHETIERE	GUENIOT	MATHIEU	SCHWARTZ
BRANCA	HEITZ-BOYER	METZGER	TANON
CHAMPY	JOYEUX	MOCQUOT	TERRIEN
CHEVASSU	LABBE (Henri)	MULON	VILLARET
CHIRAY	LAIGNEL-LAVASTINE	OKINCZYC	TIFFENEAU
CLERC	LANGLOIS	PHILIBERT	
DESMAREST	LARDENNOIS	RATHERY	
DEBRE	LE LORIER	RETTERRER	

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON BEAU-PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MA TANTE

AU DOCTEUR G. PAUL-BONCOUR

professeur à l'Ecole d'Anthropologie

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR A. DESGREZ

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine
Professeur de chimie à la Faculté de Médecine

En témoignage de mon respectueux attachement et de toute
ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle
il m'a ouvert son laboratoire et guidé dans mes recherches.

A MONSIEUR LE DOCTEUR F. RATHERY

professeur agrégé à la Faculté de Médecine
Médecin de l'hôpital Tenon

En remerciement du bienveillant accueil qu'il m'a toujours
réservé dans son service

A MONSIEUR LE DOCTEUR A. BLANCHETIÈRE

professeur agrégé à la Faculté de Médecine
dont les conseils m'ont été précieux

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX :

Stage

MONSIEUR LE PROFESSEUR GILBERT

Membre de l'Académie de Médecine

Professeur de clinique médicale

Médecin de l'Hôtel Dieu

MONSIEUR LE DOCTEUR ROBINEAU

Chirurgien de l'hôpital Necker

MONSIEUR LE PROFESSEUR NOBÉCOURT

Membre de l'Académie de Médecine

Professeur de Clinique médicale infantile

Médecin de l'hôpital des Enfants-Malades

Externat

MONSIEUR LE DOCTEUR BOIDIN

Médecin de l'hôpital Tenon

MONSIEUR LE DOCTEUR PISSAVY

Médecin de l'hôpital Cochin

MONSIEUR LE DOCTEUR TIXIER

Médecin des hôpitaux

MONSIEUR LE DOCTEUR TROISIÈRE

Médecin des hôpitaux

INTRODUCTION

Dans une première partie de ce travail nous présenterons des observations et expériences personnelles sur les propriétés de plusieurs osazones ainsi qu'une étude d'ensemble de quelques-uns de ces corps envisagés comme moyens d'identification des sucres dans les milieux biologiques.

Ensuite nous discuterons la question si confuse de la caractérisation des pentoses dans l'urine et des causes d'erreur qui résultent de la présence de l'acide glycuronique.

Nous terminerons par l'examen des différentes théories qui ont été proposées pour expliquer la pentosurie essentielle et nous ferons valoir quelques arguments en faveur d'une hypothèse déjà formulée par Klerker en 1905 et reprise par Cammidge en 1920.

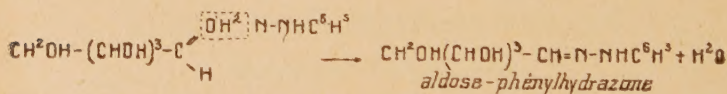
CHAPITRE I

Généralités sur les combinaisons des sucres avec les hydrazines

La réaction bien connue de la phénylhydrazine sur les sucres, due à E. Fischer, est intéressante pour le biologiste et le médecin. Elle permet en effet de caractériser les sucres en solution dans des liquides complexes tels que le sang et l'urine.

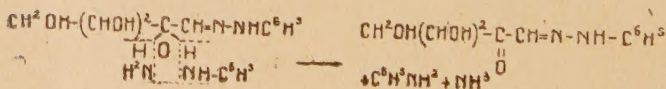
Si trois molécules d'acétate de phénylhydrazine se trouvent en présence d'une molécule de sucre à la température du bain-marie, il se forme une osazone.

La réaction a lieu en trois phases. Soit par exemple un aldopentose. Il donne par sa fonction aldéhyde une phénylhydrazone.

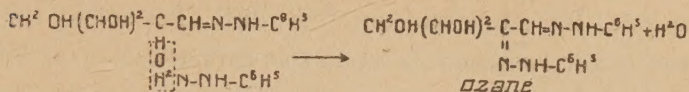


Une seconde molécule de phénylhydrazine réagit sur la fonction alcool secondaire voisine du groupement hydrazone.

Il se fait de l'aniline et de l'ammoniaque.



La fonction cétone formée réagit immédiatement sur une troisième molécule de phénylhydrazine.

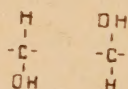


Les osazones sont des corps cristallisés, jaunes, pratiquement insolubles dans l'eau froide. Il est donc aisé de les recueillir, de les purifier et de les étudier.

On trouve décrits dans les livres les caractères des cristaux et leur point de fusion. Malheureusement, tous ceux qui ont préparé des osazones savent combien les formes cristallines de ces corps sont variables suivant les conditions expérimentales. Nous préciserons cependant les cas dans lesquels on observe des aspects caractéristiques. Quant au point de fusion, l'on pourrait croire que c'est là une constante au sujet de laquelle tous les auteurs doivent s'entendre. En réalité, il n'en est rien. Les chimistes ont noté, il y a longtemps, que le point de fusion d'une substance est susceptible de variations suivant la manière d'opérer. Dans le cas particulier des osazones, Maquenne, dans son ouvrage sur les sucres (1), fit remarquer l'influence du temps de chauffe sur le point de fusion des osazones. C'est pourquoi tous les expérimentateurs français ont adopté la méthode préconisée par ce dernier auteur et qui consiste à projeter de degré en degré une parcelle de substance sur un bloc de cuivre progressivement chauffé. Nous avons étudié les points de fusion de quelques osazones et nous avons déterminé, dans le cas l'arabinosazone et de la lactosazone, les conditions qui permettent d'obtenir un point de fusion caractéristique.

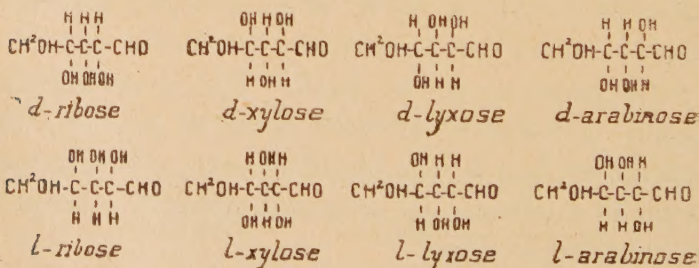
Lorsqu'on aborde le problème de l'identification d'un sucre, il importe donc d'être prévenu des difficultés que l'on peut rencontrer dans l'étude des propriétés de son osazone. En admettant que ces difficultés soient vaincues et que l'osazone du sucre soit caractérisée avec certitude, le problème est-il résolu ? En aucune façon. L'étude stéréochimique des sucres montre, en effet, qu'à deux sucres différents peut correspondre une seule et même osazone.

On sait que l'isomérisie stéréochimique est due aux positions différentes que peuvent occuper les atomes d'hydrogène et les oxhydriles des fonctions alcool secondaire par rapport aux atomes de carbone. Ces positions peuvent être schématisées de la façon suivante :



On obtient le nombre et la constitution de tous les isomères d'un même groupe en distribuant de toutes les manières possibles les H et les OH au-dessus et au-dessous de la chaîne carbonée.

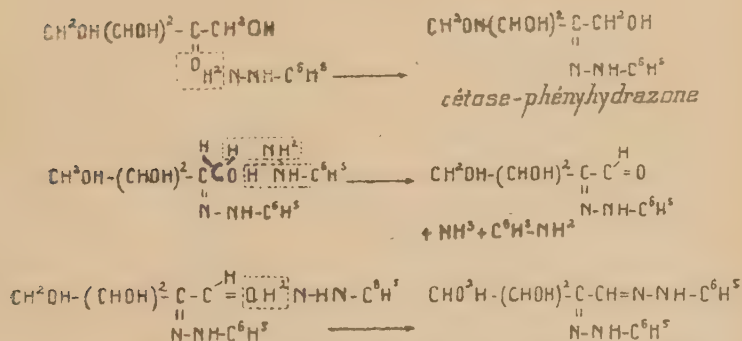
Prenons, par exemple, le groupe des aldopentoses. Il y a huit isomères possibles, tous actifs sur la lumière polarisée et deux à deux inverses optiques (on ne compte pas les racémiques).



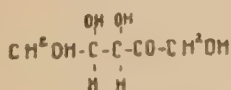
Les deux premières fonctions alcool secondaire du d-arabinose et du d-ribose sont identiques. Il en est de même pour le d-xylose et le l-lyxose. Donc, à ces quatre sucres correspondent seulement deux osazones que nous appellerons respectivement d-arabinosazone et d-xylosazone. Une remarque analogue s'applique, d'une part, au l-arabinose et au l-ribose et, d'autre part, au l-xylose et au d-lyxose qui fournissent la l-arabinosazone et la l-xylosazone. Par conséquent, huit sucres différents donnent quatre osazones deux à deux inverses optiques.

Une complication survient du fait que les sucres à fonction cétone réagissent sur la phénylhydrazine d'une façon analogue aux aldoses.

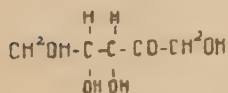
Soit un cétopentose. On a :



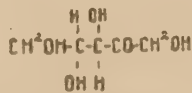
La théorie prévoit l'existence de quatre pentoses à fonction cétone.



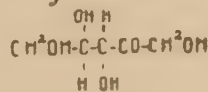
l-arabocétose



d-arabocétose



l-xylocétose



d-xylocétose

Il est clair que les arabinosazones et xylosazones obtenues à partir des cétopentoses sont identiques à celles des aldopentoses. En définitive, à une osazone donnée, la l-arabinosazone, par exemple, correspondent trois sucres différents : le l-arabinose, le l-ribose et le l-arabocétose.

D'après ce qui précède, on comprend que la caractérisation exacte d'une osazone laisse encore indéterminé le problème de l'identification du sucre initial. C'est pourquoi l'on a recherché des corps donnant avec les sucres des composés absolument caractéristiques. Si l'on se reporte aux schémas représentant la première phase de la réaction de la phénylhydrazine sur un sucre, on constate aisément qu'à une hydrazone donnée ne peut correspondre qu'un seul sucre. Malheureusement, les phénylhydrazones ne s'obtiennent pas, en général, aussi facilement que les osazones. Différents chimistes ont proposé des hydrazines substituées réagissant mieux, certaines d'entre elles présentant même une affinité élective pour des sucres déterminés. Citons, par exemple, la parabromophénylhydrazine (2), les métanitro et paranitrophénylhydrazines (3), les méthyl, éthyl, allyl, amyl et benzylphénylhydrazines (4), la diphénylhydrazine (5), la diphénylméthane-diméthylldihydrazine (6) $\text{CH}_2[\text{C}^6\text{H}_4\text{-NCH}_3\text{-NH}_2]^2$, la β naphtylhydrazine (7). Pour obtenir des hydrazones à partir de ces corps, il est nécessaire d'avoir une solution sucrée suffisamment concentrée ; dans certains cas même, le milieu doit être fortement alcoolique. Pour se conformer à ces conditions, le biologiste est souvent contraint à des manipulations longues et laborieuses.

En dehors de ces difficultés, il existe une autre raison

pour laquelle les hydrazines substituées n'entreront pas dans la pratique courante : l'industrie chimique ne les fournit pas (du moins en France) et leur préparation demanderait beaucoup de temps. Signalons cependant que Michaelis (8) a donné un procédé simple de préparation de la parabromophénylhydrazine. Ceci est intéressant, car en combinant la détermination du pouvoir rotatoire du sucre, les caractères de l'osazone, ceux de la parabromophénylhydrazone et la recherche de la fonction cétone, on peut arriver à l'identification cherchée. Nous développons ces considérations à propos de la pentosurie.

CHAPITRE II

Etude des osazones de quelques sucres, applications médicales.

Nous donnerons d'abord quelques détails sur la méthode que nous avons employée pour préparer les osazones qui ont servi à nos expériences. Nous décrirons ensuite différentes formes cristallines, en spécifiant les conditions dans lesquelles elles sont obtenues, puis nous nous occuperons de la solubilité des osazones ; nous pourrons alors étudier les moyens dont on dispose pour purifier ces corps ; enfin, nous aborderons la question des points de fusion.

1° Méthode de préparation.

Nous avons employé la phénylhydrazine et l'acide acétique cristallisable sans ajouter d'acétate de sodium, sauf dans le cas du lactose, pour une raison que nous préciserons dans la suite. Il nous a semblé avantageux de préparer l'acétate de phénylhydrazine quelques minutes avant l'emploi au lieu de conserver un réactif qui pourrait s'altérer. Il suffit de verser des quantités égales d'acide acétique et de phénylhydrazine dans un cristalliseur. Très rapidement, la réaction se produit avec un dégagement appréciable de chaleur et l'acétate cristallise, on le fait alors passer dans la solution sucrée. On évite ainsi, en

grande partie, la formation de ces gouttelettes huileuses de phénylhydrazine libre, qui viennent se rassembler à la surface lorsqu'on verse séparément la phénylhydrazine et l'acide acétique. Nous avons toujours pris une bonne précaution indiquée par différents auteurs (G. Bertrand, H. Bierry) et qui consiste à effectuer une filtration chaude quand la solution sucrée additionnée du réactif a été maintenue au bain-marie bouillant pendant le temps nécessaire pour la clarifier, c'est-à-dire cinq minutes environ. On élimine ainsi la phénylhydrazine en excès qui serait une source d'impuretés. Après cette filtration, la préparation est remise au bain-marie pendant vingt-minutes, ce qui est bien suffisant si l'on a employé l'acétate de phénylhydrazine préparé ainsi que nous l'avons dit. Nous avons remarqué, en effet, que la formation des osazones était plus rapide lorsqu'on opère ainsi.

Les solutions sucrées qui ont servi à nos préparations étaient à une concentration de un à deux pour cent. La quantité de phénylhydrazine ajoutée était calculée de telle sorte que trois molécules correspondent à une molécule de sucre.

2° Formes cristallines.

On peut formuler la règle générale suivante : pour obtenir des formes caractéristiques, il faut préparer les osazones à partir de solutions sucrées suffisamment concentrées. Les solutions à un ou deux pour cent conviennent très bien. Il faut laisser refroidir très lentement. Le mieux est de laisser dans le bain-marie, après avoir éteint le gaz, le ballon dans lequel la préparation a été faite.

Dans ces conditions les osazones présentent les aspects suivants :

Arabinosazone : longs filaments, fins, recourbés et enchevêtrés.

Xylosazone : longues aiguilles isolées.

Glucosazone : aspect en branche de genêt classique.

Galactosazone : larges lamelles tantôt isolées, tantôt groupées en rosaces.

Lactosazone : sphérules entourées d'un chevelu de filaments.

Maltosazone : aiguilles formant de belles rosaces.

Nous avons préparé des osazones à partir de solutions étendues et fait les remarques suivantes :

Lorsque les osazones se forment à partir de solutions à $\frac{1}{500}$ ou $\frac{1}{1000}$, plusieurs cas sont à distinguer.

La lactosazone ne change pas d'aspect.

La glucosazone peut prendre plusieurs formes différentes : courtes aiguilles isolées ; minuscules branches de genêt, petits oursins.

Les osazones des pentoses se transforment complètement. L'arabinosazone cristallise en sphérules hérissées de pointes très fines, très courtes et pressées les unes contre les autres. La xylosazone cristallise en oursins dont les aiguilles, plus longues et plus espacées, ne permettent aucune confusion avec l'arabinosazone, mais ces oursins peuvent au contraire se confondre très facilement avec ceux de la glucosazone.

Ces notions trouvent leur application en clinique. Dans le cas d'une urine contenant une proportion de sucre égale ou supérieure à 1 %, l'aspect caractéristique

des cristaux d'osazone est un élément précieux pour le diagnostic. Au contraire, s'il s'agit d'identifier un sucre dont la concentration dans l'urine ne dépasse pas $\frac{1}{500}$ le renseignement donné par le microscope sera, en général, de peu de valeur.

Il nous semble cependant que l'on doive faire une exception pour le lactose dont l'osazone présente un aspect très spécial et remarquablement constant. Le diagnostic de la lactosurie nous paraît de ce fait grandement facilité.

Il n'en est pas de même de la pentosurie. La caractérisation de petites quantités de pentoses dans l'urine est gênée par la présence de l'acide glycuronique. En effet, M. Bernier (9) a établi que par l'action de l'acétate de phénylhydrazine sur l'urine normale on obtenait une très faible quantité de glycurossazone. Il a noté de plus que la glycurossazone pouvait revêtir les aspects cristallins les plus variés et, en particulier, se présenter sous la forme d'oursins. Nous avons préparé de la glycurossazone et observé des cristaux dont l'aspect était intermédiaire entre celui de l'arabinosazone et celui de la xylosazone obtenues à partir de solutions diluées. Si nous ajoutons que la glucosazone est capable de prendre des formes analogues, il est clair que l'examen microscopique des cristaux d'osazone ne peut être d'aucun secours pour le diagnostic d'une faible pentosurie.

3° Solubilité

Eau. Les osazones des pentoses sont assez solubles dans l'eau bouillante. La glucosazone y est peu soluble ; cependant, sa solubilité est loin d'être négligeable, ainsi

que l'avaient déjà noté Külz et Vogel en 1895 (10). Ces auteurs, recherchant la pentosurie dans le diabète, eurent l'idée de se servir de l'eau chaude pour séparer la glucosazone des osazones des pentoses qu'ils supposaient exister dans l'urine des diabétiques. Ils procédèrent à un long épuisement (quinze fois douze heures) par l'eau à 60 degrés de l'osazone obtenue à partir de 1300 à 3.700 cent. cubes d'urines de diabétiques et isolèrent ainsi 0 gr.25 à 0 gr.47 d'un produit cristallisant en aiguilles et fondant à 158° au tube capillaire. La teneur en azote était 17, 12%. Ils pensèrent avoir ainsi caractérisé la xylosazone (point de fusion au tube capillaire 160°, azote 17, 07 %). W. Voit (11) a répété avec succès les expériences de Külz et Vogel. Bendix au contraire (12) ne put y parvenir.

Nous ferons observer que la méthode de Külz et Vogel est entachée d'une cause d'erreur, M. Bernier (9) a démontré que l'on obtient d'une façon constante à partir de l'urine normale, sans hydrolyse préalable, une très petite quantité d'une osazone fondant à 130-132 au bloc Maquenne. Cette osazone est celle de l'acide glycuronique, elle est soluble dans l'eau chaude. Or M. Bierry (13) a signalé, dans le cas du lactose, que la présence d'une osazone soluble favorise la dissolution d'une osazone peu soluble. La glycurossazone peut avoir ainsi entraîné en solution un peu de glucosazone. Cette dernière fond à 205° au tube capillaire. Il est possible que son point de fusion se soit abaissé jusqu'à 158°, par suite de son mélange avec la glycurossazone. On peut objecter à cette manière de voir que la quantité d'osazone obtenu par M. Bernier, à partir de l'urine non hydrolysée, était toujours très faible. Il faut considérer que M. Bernier opérait sur 100 à 200 cent. cu-

bes, alors que Kütz et Vogel traitaient plusieurs litres. D'autre part, on n'a pas encore étudié, à notre connaissance, la glycuronurie au cours du diabète. Il n'est pas sûr que les urines des diabétiques ne contiennent pas assez d'acide glycuronique pour former une quantité appréciable de glycuosazone.

La galactosazone est à peine plus soluble dans l'eau chaude que la glucosazone. La lactosazone et la maltosazone y sont, au contraire très solubles.

Benzène, toluène, xylènes. Ne dissolvent pratiquement pas les osazones à froid, mais la solubilité n'est pas négligeable à l'ébullition.

Alcool méthylique. La glucosazone et la galactosazone y sont peu solubles (G. Bertrand, 14). Les osazones des pentoses y sont, au contraire, très solubles, ce qui permet de les séparer des premières (G. Bertrand, 14). Nous décrirons plus loin un procédé qui nous a semblé préférable.

Alcool éthylique. La glucosazone est plus soluble dans l'alcool à 60° que dans l'alcool absolu. Les autres osazones sont très solubles dans l'alcool à 95°

Alcool amylique. C'est un mauvais dissolvant des osazones. Nous avons remarqué qu'il dissout, au contraire, très bien leurs impuretés.

Acétate d'éthyle. Dissout assez mal les osazones à froid. Cependant, la solubilité des osazones des pentoses n'est pas négligeable. A chaud, cette solubilité, médiocre pour la plupart des osazones, est assez grande pour celles des pentoses.

Ether. N'est pas un bon dissolvant des osazones.

Acétone. L'acétone pure dissout toutes les osazones mais d'une façon inégale. La glucosazone et la galactosazone y sont peu solubles. La lactosazone y est assez soluble et la solubilité des osazones des pentoses est très grande. M. Bierry a montré (15) que l'acétone étendue de son volume d'eau dissout très peu la glucosazone. Il a utilisé cette propriété pour séparer la lactosazone de la glucosazone. Nous avons réussi à séparer la xylosazone de la glucosazone par ce dissolvant. Voici la technique employée par nous : On fait réagir la solution sucrée sur la phénylhydrazine dans les conditions indiquées plus haut. On a soin de laisser refroidir dans l'eau fraîche pendant au moins quatre heures le ballon dans lequel on a fait la réaction. On filtre on lave à l'eau jusqu'à ce que le liquide filtré soit neutre au tournesol. On reprend alors par l'eau dans une capsule de porcelaine, on chauffe jusqu'à l'ébullition que l'on maintient une demi minute on filtre ensuite sur un entonnoir à filtration chaude.

La xylosazone s'est dissoute à peu près complètement, la glucosazone est restée en grande partie sur le filtre.

Dans le filtrat, il cristallise un mélange de glucosazone et de xylosazone. Après quatre heures de refroidissement, on filtre, on lave à l'eau, on essore entre deux feuilles de papier à filtrer et l'on dessèche dans le vide, en présence d'acide sulfurique. Le produit sec et pulvérisé, introduit dans un tube à centrifuger, est agité avec une petite quantité de benzine. Le liquide est séparé par centrifugation : on décante le benzène qui a dissous les impuretés. On recommence plusieurs fois cette opération. On attend le temps nécessaire pour l'évaporation du benzène imprégnant les osazones. Elles sont alors

traitées par un mélange à parties égales d'acétone et d'eau, en agitant pendant une minute. La glucosazone insoluble se sépare par centrifugation. On décante dans un cristalliseur, il cristallise de la xylosazone plus ou moins pure suivant la proportion de xylose dans la solution sucrée. Après dessiccation, l'osazone est traitée de nouveau par la plus petite quantité possible du mélange acétone-eau ; on centrifuge et l'on refait cristalliser. Après plusieurs extractions fractionnées, on peut prendre le point de fusion du produit obtenu. A partir d'un mélange de 1 gr. de glucose et de 0 gr. 50 de xylose, nous avons isolé une osazone fondant à 165° (1). La xylosazone pure fond à 168°. La séparation peut donc être considérée comme satisfaisante. Avec des mélanges contenant seulement un dixième de xylose, l'osazone extraite fondait à 160-162°.

Cette méthode peut-elle servir à la caractérisation du xylose dans l'urine des diabétiques ? Elle est passible des mêmes objections que celle de Külz et Vogel. En effet, la glycurossazone est soluble dans l'acétone étendue de son volume d'eau (Bernier, 9). Il faudrait, pour que cette cause d'erreur fût négligeable, que la proportion de xylose, par rapport au glucose, fût supérieure à un pour dix.

Quant à la caractérisation de petites quantités d'arabinose en présence de glucose, elle présente des difficultés spéciales, en raison d'un phénomène dont nous parlerons à propos des points de fusion. Nous avons effectué un essai sans résultat satisfaisant.

(1) A moins d'indication contraire, nos points de fusion sont pris au bloc Maquenné.

Amines, amides, hydrazines. Neuberg a étudié (16) la solubilité des osazones dans cette famille de corps. Il a montré, en particulier, que les solutions d'acides aminés, les solutions d'urée portées à l'ébullition dissolvent mieux les osazones que l'eau pure. Ceci explique que la quantité d'osazone préparée à partir d'une urine sucrée soit plus faible que la quantité prévue d'après le dosage du sucre.

La phénylhydrazine dissout les osazones ; il est donc important de n'en pas mettre un excès.

Pyridine. C'est encore à Neuberg (17) que l'on doit les remarques les plus intéressantes sur la solubilité des osazones dans la pyridine. Cette solubilité est à peu près la même pour toutes les osazones. A froid 1 gr. de pyridine dissout 0 gr. 50 de glucosazone. A chaud 0 gr. 60.

Neuberg (17) a étudié le pouvoir rotatoire de quelques osazones dans un mélange de 4 cent. cubes de pyridine et 6 centi. cubes d'alcool. L'osazone du d-glucose est lévogyre. Celle du l-arabinose est dextrogyre. Celle du l-xylose est lévogyre.

Plus récemment Levene et La Forge (18) ont repris la question. D'après ces auteurs le pouvoir rotatoire est la propriété qui est la moins influencée par la présence d'impuretés. Les osazones présentent le phénomène de la multitrotation mais leur pouvoir rotatoire stable est constant. Cette propriété physique peut donc être utilisée pour la caractérisation des sucres. L'application au diagnostic de la pentosurie a été faite par Zerner et Waltuch (19) et par Levene et La Forge (20).

4° Purification

Pour les osazones solubles dans l'eau chaude on recommande généralement d'effectuer plusieurs dissolutions successives. La technique suivante nous semble particulièrement efficace. L'osazone obtenue est lavée à l'eau puis essorée à la trompe. On la triture alors dans une capsule de porcelaine avec quelques centimètres cubes de benzène. Il se fait une masse pâteuse. On décante le benzène sans difficulté et l'on recommence ainsi plusieurs fois. On reprend ensuite par l'eau bouillante dans la même capsule. On filtre à chaud. L'osazone précipite par refroidissement. On peut alors reprendre une ou deux fois par l'eau. Ce procédé s'applique bien à la lactosazone et à la maltosazone. Il est moins commode pour les osazones des pentoses qui exigent une plus grande quantité d'eau pour se dissoudre. C'est pourquoi nous avons cherché un procédé plus pratique.

Nous avons eu l'idée de mettre à profit la très grande solubilité des osazones des pentoses dans l'acétone et leur très faible solubilité dans le benzène. Les osazones sont dissoutes dans un excès d'acétone puis on ajoute le benzène goutte à goutte jusqu'à formation d'un louche persistant par agitation. On abandonne alors à la cristallisation. L'acétone étant plus volatile que le benzène les osazones ne tardent pas à se déposer, les impuretés restant dissoutes dans le benzène. Il faut avoir soin de mettre une quantité suffisante de benzène. Si par suite de l'évaporation de l'acétone la quantité de liquide devenait trop

faible, on aurait la désagréable surprise de voir la solution se prendre en gelée.

L'aspect des cristaux obtenus dans le mélange acétone-benzène est différent selon qu'il s'agit de xylose ou d'arabinose. La xylosazone cristallise en sphérules hérissées de fines aiguilles qui ne sont pas sans analogie avec celles de la lactosazone cristallisée dans l'eau. L'arabinosazone au contraire cristallise en oursins formés par le groupement de petits prismes courts et massifs.

Quant à la glucosazone, nous pensons que l'on obtient par le procédé suivant une purification suffisante. Il suffit d'agiter dans un tube à centrifuger de 50 cent. cubes avec de l'acétate d'éthyle ; on centrifuge, on décante le liquide brunâtre séparé. On recommence jusqu'à ce que le liquide soit jaune clair. La quantité d'osazone perdue est très faible.

Neuberg (17) préconise la dissolution dans la pyridine et la précipitation par l'éther ou la ligroïne.

5° Points de fusion

La lecture des ouvrages d'enseignement pourrait faire croire que l'identification d'un sucre par le point de fusion de son osazone est toujours chose facile. En réalité, lorsqu'on se reporte aux mémoires originaux et que l'on compare les points de fusion donnés par des expérimentateurs dont il est impossible de mettre en doute la conscience et l'habileté, on constate des différences parfois considérables, atteignant par exemple vingt-trois degrés. La notoriété des auteurs que nous allons citer ne permet pas de les attribuer à des impuretés.

Voici les chiffres (1) que nous avons relevés pour les sucres étudiés dans ce travail :

Glucosazone	205 (corrigé 208) E. Fischer (21). 208 Levene et La Forge (18) 230-232. G. Bertrand, cité par Le Goff. (22) et (23).
Galactosazone	193-94 E. Fischer (24) 201 Levene et La Forge (18) 214 G. Bertrand (23)
Lactosazone	Début de la fusion 200, fin 210-12. E. Fischer. (21). 200 environ G. Bertrand (23) 213-215 Grimbert (25)
Maltozazone	206 E. Fischer (24) 206 G. Bertrand (23).
Arabinosazone	160 E. Fischer (26) 159-160 Wohl. (27). Wheeler et Tollens (28) 160 Zerner et Waltuch (19) 166 Levene et La Forge (18) 143 G. Bertrand (23)
Xylosazone	160 E. Fischer (26) 159-160 Wheeler et Tollens (28) 164 Levene et La Forge (18) 164-165 Zerner et Waltuch (19) 166 G. Bertrand (14) et (23).

Ce qui frappe lorsqu'on examine le précédent tableau

(1) Ces chiffres sont relatifs aux corps actifs sur la lumière polarisée. Le point de fusion des osazones obtenues à partir des racémiques est quelquefois différent.

c'est que les Américains et les Allemands donnent des chiffres à peu près concordants. D'autre part M. G. Bertrand pour trois des osazones ci-dessus mentionnées, obtient des résultats très différents. Les auteurs allemands et américains opèrent avec le tube capillaire, M. G. Bertrand au contraire comme tous les chimistes français se sert du bloc Maquenne. La seconde technique est évidemment la meilleure. La cause des divergences est donc bien due à la méthode employée.

E. Fischer fait lui-même le procès de sa manière de procéder. La plupart des osazones, dit-il, (21) fondent avec décomposition, le corps noircit et il se dégage des gaz. Il donne ensuite quelques détails sur sa technique. Il chauffe de telle façon que la température s'élève de un degré par deux ou trois secondes et il supprime la source de chaleur un instant avant que le bain ait atteint la température de fusion de l'osazone. Si l'on chauffe la glucosazone pendant une minute à 195-200, remarque Fischer (21), la fusion avec décomposition se produit à 200. Pour la galactosazone le même auteur (24) signale que la décomposition commence un peu vers 180 alors que la fusion n'a lieu qu'à 193-94. Wheeler et Tollens (28) ont fait des observations analogues sur la xylosazone. Si l'on chauffe lentement elle fond à 155 et suivant la vitesse de chauffage on obtient 158, 159, 160. Ces faits montrent bien que la chaleur altère très facilement les osazones, ce qui a pour effet d'abaisser leur point de fusion. C'est pourquoi la recherche du point de fusion immédiate au bloc Maquenne est infiniment préférable et conduit à des chiffres notablement plus élevés surtout dans le cas de la glucosazone et de la galactosazone. En effet ces deux osazo-

nes fondent au-dessus de 200 et doivent de ce fait subir plus longtemps que la xylosazone l'action de la chaleur si l'on opère au tube capillaire.

La maltosazone fond à 206 aussi bien au bloc Maquenne qu'au tube capillaire. Sans doute est-elle plus résistante à l'action de la chaleur.

Les osazones du lactose et de l'arabinose présentent une particularité très intéressante. Envisageons d'abord le cas du lactose. E. Fischer décrit non pas un point mais un intervalle de fusion 200-212. M. G. Bertrand indique 200 environ, il lui a donc été impossible de fixer un chiffre exact. M. Grimbert a trouvé 213-215. Une expérience de E. Fischer (24) que nous avons vérifiée et complétée donne l'explication de cette incertitude. Il a préparé à partir de la lactosazone un corps fondant à 224° au tube capillaire qui est un anhydride de la lactosazone.

Voici la technique de la préparation : 10 grammes de lactosazone sont dissous dans un litre d'eau bouillante, on ajoute un cent. cube d'acide sulfurique à 20 %. On laisse au bain-marie bouillant pendant une heure et demie à deux heures. Il se dépose une substance cristallisée en aiguilles assez longues. Ce corps est soluble dans l'alcool absolu à chaud et presque insoluble dans l'eau bouillante.

Nous avons répété cette expérience et purifié le corps obtenu par cristallisation dans l'alcool méthylique. Le point de fusion au bloc Maquenne fut 226°. L'accord est donc satisfaisant.

E. Fischer a effectué l'analyse élémentaire de cette substance et a trouvé les résultats suivants :

	<i>Trouvé</i>	<i>Calculé pour C²⁴ H³⁰ N⁴ O⁸</i>
Carbone	57,2 %	57,37 %
Hydrogène	6,25 %	5,98 %
Azote	11,06 %	11,15 %

La lactosazone ne contenant que 55,38 % de carbone, cette analyse ne laisse aucun doute sur la réalité de l'anhydride en question.

Nous avons pensé que cette réaction d'anhydrisation qui est catalysée par les ions H devait se produire plus ou moins lorsqu'on prépare de la lactosazone en milieu acétique. En effet, l'expérience suivante le montre bien. Une certaine quantité de lactosazone (0 gr, 30 environ) est dissoute dans 100 cent-cubes d'eau bouillante additionnés de 1 cent. cube d'acide acétique cristallisable. On laisse au bain-marie une heure. Si l'on examine alors le liquide on constate la présence de quelques aiguilles insolubles à chaud. Par refroidissement il se fait un précipité dans lequel on distingue au microscope des aiguilles identiques à celles de l'anhydride de Fischer. Le produit desséché, lavé à l'acétate d'éthyle, est purifié par deux cristallisations dans l'alcool méthylique et desséché dans le vide. Son point de fusion au bloc Maquenne ne peut pas être déterminé exactement. A partir de 180 degrés, on observe un changement d'état fugace et les parcelles projetées sur le bloc reprennent, en quelques secondes, l'état solide. C'est seulement à 218° que nous avons observé la véritable fusion. Nous pensons que cette anomalie est due au mélange de la lactosazone avec son anhydride.

Dans les conditions ordinaires de la préparation de la lactosazone, il doit se produire une quantité plus ou moins considérable de son anhydride. C'est ce qui expli-

querait l'incertitude notée par M. G. Bertrand et le point de fusion peu précis et notablement plus élevé donné par M. Grimbart. Personnellement nous avons trouvé des chiffres variant entre 198 et 203 avec des produits préparés en présence d'acétate de sodium (le double de la quantité d'acide acétique) afin de faire reculer l'ionisation de l'acide acétique.

Reste à expliquer pourquoi la lactosazone présente un intervalle de fusion de 12 degrés lorsqu'on la chauffe au tube capillaire. L'expérience suivante répond à la question. Elle consiste à soumettre la lactosazone à l'influence d'une température de 160 degrés pendant une demi-heure. Quelques milligrammes de cette substance sont placés dans un petit tube de verre de cinq millimètres environ de diamètre. Ce petit tube est fixé à un thermomètre avec une bague de caoutchouc de telle sorte que le fond du tube corresponde au milieu du réservoir. L'extrémité du tube et le réservoir sont plongés dans un bain d'huile de paraffine. On chauffe alors rapidement jusque vers 150° et l'on règle ensuite le gaz de telle façon que la température reste à peu près constante aux environs de 160°. Après une demi-heure, le tube est enlevé, on le laisse refroidir dans un dessiccateur et l'on prend le point de fusion au bloc Maquenne.

Dans ces conditions, la fusion se produit à 224-226. Tout semble donc se passer comme si la chaleur était capable de transformer la lactosazone en son anhydride. Cette expérience explique pourquoi E. Fischer a trouvé pour la lactosazone un si long intervalle de fusion. Le chauffage produit une anhydrisation partielle de la substance en expérience et l'on sait que les mélanges présen-

tent non pas un point de fusion net mais un intervalle de fusion plus ou moins étendu.

Cette expérience permet en outre de caractériser nettement le lactose par le point de fusion de son osazone. On prépare la lactosazone en présence d'acétate de sodium et sans laisser plus d'un quart d'heure au bain-marie. On obtient dans ces conditions, après purification et dessiccation dans le vide, un corps qui fond vers 200° au bloc Maquenne. Ce produit est alors chauffé vers 160° pendant une demi-heure comme il vient d'être dit. Le point de fusion passe à 224-226°. Ce phénomène est caractéristique du lactose. Il n'est donné ni par le maltose ni par le glucose, ni par le galactose, seuls sucres fréquemment rencontrés dont l'osazone fond à une température supérieure à 200°. Les osazones de ces trois derniers sucres traitées par la chaleur dans les mêmes conditions que la lactosazone présentent au contraire un abaissement plus ou moins notable de leur point de fusion. La technique proposée ci-dessus peut donc rendre des services pour l'identification du lactose.

Quant à l'osazone de l'arabinose, elle fond à 143° d'après M. G. Bertrand et vers 160° d'après les auteurs américains et allemands. Nos expériences ont été effectuées sur des produits purifiés par plusieurs dissolutions dans l'eau chaude (au bain-marie) et desséchés dans le vide, en présence d'acide sulfurique, jusqu'à poids constant. Le point de fusion pris au bloc Maquenne a été 143°, au tube capillaire 160°. La différence entre les résultats donnés par M. G. Bertrand et par les expérimentateurs étrangers est donc bien due à la technique employée.

Nous avons essayé d'expliquer cette différence. Tout

d'abord une petite remarque a été pour nous une indication utile. Lorsqu'on projette quelques parcelles d'arabinosazone finement pulvérisée sur un bloc Maquenne maintenu à 143° l'on observe bien la fusion immédiate mais, si au lieu d'essuyer les gouttelettes liquides, on les laisse un instant sur le bloc, elles ne tardent pas à reprendre l'état solide. Nous avons pensé qu'il se produisait peut-être sous l'influence de la chaleur une anhydri-sation comme dans le cas du lactose. Nous avons donc soumis l'arabinosazone à l'action de la chaleur à l'étuve vers 100-110 pendant un quart-d'heure. La fusion immédiate au bloc Maquenne a lieu dans ces conditions à 166°.

Nous avons donc reproduit ainsi le phénomène qui se passe lorsqu'on prend le point de fusion au tube capillaire.

Tout à fait par hasard, nous avons provoqué d'une autre manière ce changement dans le point de fusion de l'arabinosazone. Cherchant une bonne méthode de purification des osazones des pentoses, nous avons eu l'idée de les faire cristalliser dans un mélange d'acétone et de benzène. Dans ces conditions le point de fusion est 169-170° pour l'arabinosazone et 168° pour la xylosazone (au bloc Maquenne). Ce dernier chiffre est donc très voisin de celui donné par M. G. Bertrand. Ajoutons que nous avons pris le point de fusion de la xylosazone au tube capillaire et trouvé un résultat conforme à celui des auteurs allemands (fusion à 162). D'autre part, nous avons chauffé la xylosazone à 120°, au bain d'huile, pendant un quart d'heure, son point de fusion, pris au bloc, a été 164.

L'élévation du point de fusion, sous l'influence de la chaleur ou de la dissolution dans des solvants organi-

ques, distingue donc nettement l'arabinosazone de la xylosazone.

Nous avons cherché quelle pouvait être la raison de cette différence. Il était tout naturel de rapprocher ce fait de ce qui a été dit pour le lactose et de penser à une anhydrisation. C'est pourquoi nous avons procédé à l'analyse élémentaire d'un échantillon d'arabinosazone, purifiée par trois cristallisations dans le mélange acétone-benzène.

Le résultat ne fut pas ce que nous attendions. Le corps fondant à 169-170° n'est pas un anhydride mais bien l'arabinosazone elle-même.

	<i>Trouvé</i>	<i>Calculé pour l'arabinosazone</i>	<i>Calculé pour l'anhydride</i>
		$C^{17} H^{20} N^4 O^3$	$C^{17} H^{16} N^4 O^2$
Carbone	61,78 %	62,19 %	65,80 %
	6,42 %	6,09 %	5,80 %

Il est possible que le corps fondant à 143° soit un hydrate défini de l'arabinosazone. Quoi qu'il en soit, les caractères des cristaux obtenus dans le mélange acétone-benzène, joints à une connaissance plus précise des points de fusion et de leur variation dans le cas de l'arabinose, peuvent être utiles pour le diagnostic de le pentosurie et l'identification du pentose urinaire.

CHAPITRE III

Identification des pentoses dans l'urine.

Nous nous proposons, dans ce chapitre, de passer en revue les méthodes qui ont été employées pour déceler et identifier les pentoses dans l'urine, en insistant sur les causes d'erreur dues à l'acide glycuronique.

Nous nous occuperons d'abord du cas le plus simple, celui dans lequel le pentose est le seul hydrate de carbone anormal de l'urine (1).

On dispose, pour étudier les pentoses, d'une méthode physique, de plusieurs méthodes chimiques et d'une méthode biologique. Nous envisagerons successivement l'action sur la lumière polarisée, le pouvoir réducteur, les réactions colorées, l'oxydation par le brome, les combinaisons avec les hydrazines, la fermentation.

Pouvoir rotatoire. — Afin d'éviter toute confusion, nous rappelons que la lettre d ou l précédant le nom d'un sucre ne désigne pas forcément le pouvoir rotatoire effectif de ce sucre, mais exprime plutôt une parenté sté-

(1) Pour certains auteurs (Gilbert et Baudouin 29) il existerait une petite quantité de pentose dans l'urine normale. La discussion de leurs résultats soulèverait la question encore si obscure des hydrates de carbone normaux de l'urine. Elle sortirait du cadre de ce travail.

réochimique avec des corps dont l'activité optique est réellement en accord avec le symbole qui les précède. Le l-arabinose qui est dextrogyre appartient à la série l, car sa constitution découle de celle de l'acide l-gluconique. Or cet acide est un produit d'oxydation du l-glucose, lequel est effectivement lévogyre.

Le l-arabinose, le l-xylose, le l-ribose, le l-lyxose ⁽¹⁾ et le d-xylocétose sont dextrogyres. On en déduit que leurs inverses optiques sont lévogyres. Le pouvoir rotatoire des arabocétoses n'a pas encore été déterminé, à notre connaissance.

Dans la plupart des cas de pentosurie publiés, les urines étaient inactives sur la lumière polarisée. Ce fait peut s'expliquer de deux façons. Ou bien le sucre était un racémique ou bien sa concentration était insuffisante et son pouvoir rotatoire spécifique trop faible pour produire une rotation appréciable. Remarquons de plus que le léger pouvoir rotatoire gauche de l'urine normale, attribué aux conjugués glycuroniques (Flückiger 30, Mayer et Neuberg 31) peut compenser l'action d'une petite quantité de sucre dextrogyre.

Il semble que, dans beaucoup d'observations, le pentose urinaire était le d-l-arabinose. Neuberg dans un cas (32) et Cammidge dans trois cas (33) ont isolé le sucre de l'urine et démontré sa nature de racémique. D'autre part les urines examinées par Luzatto (34), Zerner et Waltuch (19) étaient inactives alors que le sucre lui-même était actif.

(1) Le l-lyxose est encore inconnu mais son inverse optique le d-lyxose a été préparé, il est lévogyre.

Rosenfeld (35), Blumenthal (36), Schüler (37) ont observé des urines dextrogyres correspondant à l'existence d'un pentose actif.

Adler (38), Blum (39) signalent des cas de pentosurie avec urines lévogyres. Il semble bien que ce pouvoir rotatoire gauche soit attribuable aux conjugués glycuroniques. Dans le premier cas en effet le pouvoir rotatoire était très faible et dans le second il était intermittent.

Pouvoir réducteur. — On a dit que les pentoses ne réduisent la liqueur de Fehling qu'après un certain temps, la réduction se produisant alors brusquement. Ce caractère est inconstant. Le pouvoir réducteur de tous les pentoses n'étant pas encore déterminé exactement, la comparaison du pouvoir réducteur d'une urine avec son pouvoir rotatoire ne donne pas, en général, de renseignement utile.

Réactions colorées. — Nous ne nous attarderons pas à décrire les réactions colorées classiques des pentoses, réaction de la phloroglucine (Tollens), réaction de Bial, réaction de l'acétate d'aniline (Hervieux). Elles perdent beaucoup de leur intérêt du fait qu'elles sont données par l'acide glycuronique, avec une intensité moindre, il est vrai. Cependant il nous semble utile de faire connaître une variante de la réaction de l'orcine proposée par Neumann (40) et qui n'est citée nulle part dans les ouvrages français.

Technique de la réaction : on met dans un tube à essais dix gouttes de la solution dans laquelle on recherche les pentoses, 5 cent. cubes d'acide acétique cristallisable

et quelques gouttes d'une solution alcoolique d'orcine à 5 %. On fait bouillir un instant puis on ajoute goutte à goutte en agitant de l'acide sulfurique concentré (vingt à trente gouttes suffisent). Résultats : l-arabinose : violet foncé, bande d'absorption dans le jaune vert à droite de D.

l-xylose : bleu, deux bandes d'absorption une identique à celle de l'arabinose, l'autre dans le jaune rouge à droite de C.

Acide glycuronique ; bleu vert ou émeraude raie dans le rouge à gauche de C.

Glucose : rouge brun, raie dans le vert à droite de B.

Nous avons effectué la réaction de Neumann sur des urines et solutions sucrées. Elle est encore très nette avec des dilutions au millième. Le rouge que nous avons obtenu avec le glucose était du rouge cerise, nullement brun. Urines normales ; légère coloration verte ; pas de bande.

Urine normale + xylose $\frac{1}{1000}$ bleu un peu verdâtre, bandes dans le rouge et le jaune.

Urine normale + arabinose $\frac{1}{1000}$ violet au fond du tube verdâtre au dessus, bandes dans le jaune et le rouge.

Urine normale + glucose $\frac{1}{100}$ rouge au fond, verdâtre au dessus, absorption du bleu et du vert.

Urines de diabétiques : coloration rouge.

Il importe de faire une expérience témoin avant d'effectuer une recherche par la réaction de Neumann. Avec de l'acide acétique impur on obtient une coloration bleue ou jaune.

En résumé l'on voit que si la confusion est possible entre le xylose et l'acide glyceuronique, la coloration violette de l'arabinose est très caractéristique. L'application de la réaction de Neumann au diagnostic de la pentosurie a été faite par Schüler (37).

M. P. Thomas (41) a proposé récemment une nouvelle réaction colorée des pentoses qu'il considère comme spécifique.

Quelques cent. cubes du réactif suivant :

β naphтол	0 gr. 30
Acide sulfurique conc.	100

sont versés dans un tube à essais contenant un cent. cube du liquide à examiner. A la limite de séparation, il se fait une coloration bleu outremer. Nous avons effectivement obtenu cette teinte avec les pentoses, mais le glucose du commerce nous a donné une coloration identique alors que l'auteur signale une coloration brun et vert.

On peut se demander si les cétopentoses donnent les mêmes réactions colorées que les aldopentoses. Il est classique de considérer les réactions de Tollens et de Bial comme dues à la formation furfural. Si cette manière de voir est exacte, il est évident que les cétopentoses ne devraient pas les donner. Cependant Levene et la Forge (42) signalent qu'ils les ont obtenues avec les urines d'un pentosurique dont le sucre, identifié plus tard, était le d-xylocétose. D'ailleurs Neuberg (43) n'est pas d'avis que les réactions dites furfuriques soient effectivement dues à la formation de furfurol.

D'après H. et A. Euler (44), le d-l-arabocétose donne la réaction de Séliwanof. Il est probable qu'il en est de même des autres cétopentoses.

Pinoff et Gude (45) ont décrit une réaction des cétooses qui a été appliquée à l'étude de la pentosurie par Levene et La Forge (20). Six grammes de molybdate d'ammoniaque sont dissous dans cinq cent. cubes d'eau à l'ébullition. On refroidit vers 40° ; on ajoute cinq cent. cubes de la solution dans laquelle on recherche le cétoose. Cette solution ne doit pas contenir d'acides libres. On laisse au bain-marie à 40°, pendant 15 minutes. Il se fait une coloration bleue. Il doit y avoir au plus un gramme et au moins 0 gr. 03 dans les cinq. cent. cubes.

Oxydation par le brome -- Cette méthode qui consiste à faire agir le brome à froid sur le sucre, pendant 48 heures, donne des résultats très différents suivant qu'il s'agit d'un aldose ou d'un cétoose.

Dans le premier cas, le sucre est complètement oxydé, ce que l'on reconnaît à la disparition du pouvoir réducteur.

Dans le second cas, la plus grande partie résiste à l'oxydation et le pouvoir réducteur diminue très peu.

Cette méthode a été appliquée à l'identification des cétopentosés par Levene et La Forge (20) et par A. Hiller (46).

Osazones — Dans la plupart des cas de pentosurie publiés, la recherche de l'osazone a été faite. Les points de fusion donnés par les auteurs sont autour de 160°, ce qui se comprend bien puisque la pentosurie n'a guère été étudiée qu'en Allemagne, en Angleterre et en Amérique où l'on prend les points de fusion au tube capillaire. Cette méthode ne permet pas de distinguer l'arabinosa-

zone de la xylosazone, au contraire, si l'on opère au bloc Maquenne, suivant la technique donnée au chapitre précédent, la confusion est impossible. Zerner et Waltuch (19) ont indiqué un procédé très commode leur ayant permis d'établir que dans leurs deux cas de pentosurie le sucre appartenait au groupe du d-xylose. On désigne ainsi les sucres correspondant à la d-xylosazone, c'est-à-dire le d-xylose, le l-xylose et le d-xylocétose. Zerner et Waltuch ont fait cristalliser dans l'acétone à 20 % des poids égaux de l-xylosazone ⁽¹⁾ et d'osazone préparée à partir de l'urine. Alors que ces deux osazones fondaient vers 160°, leur mélange fondait à 208-210°. Or, E. Fischer (47) a montré que la d-l-xylosazone, préparée à partir du d-l-xylose, (obtenu par oxydation de la xylite) fond à 210-215°. Zerner et Waltuch en ont déduit que l'osazone du pentose urinaire était la d-xylosazone, puisque son mélange avec la l-xylosazone reproduisait une osazone racémique. Si l'osazone préparée avec l'urine avait été une arabinosazone, ils auraient observé un abaissement du point de fusion. Ce procédé a été appliqué par Levene et La Forge (20) à l'étude de leur cas de pentosurie et leur a permis d'établir également que le pentose appartenait au groupe du d-xylose. La l-arabinosazone ⁽²⁾ mélangée avec son inverse optique ne donnerait pas de résultat aussi démonstratif, car la d-l-arabinosazone fond seulement à 167° (Fischer 47). Cependant, un notable abaissement du point de fusion au-dessous de 160° permettrait

(1) Le l-xylose est le xylose ordinaire, celui qui existe chez les végétaux à l'état de xylanes.

(2) Le l-arabinose est l'arabinose ordinaire.

d'éliminer aussi bien la l- que la d-arabinosazone. Il serait intéressant de vérifier ces faits, en prenant les points de fusion au bloc Maquenne et non au tube capillaire.

Il ne faudrait pas s'étonner de trouver, pour une osazone préparée à partir de l'urine, un point de fusion légèrement inférieur à celui de l'osazone préparée à partir du sucre pur. M. Bernier (9) a montré en effet que l'urine normale non hydrolysée donnait avec la phénylhydrazine une petite quantité de glycurossazone, dont les caractères de solubilité sont les mêmes que ceux des pentosazones. Toute séparation est donc impossible. D'après M. Bernier (9) la glycurossazone fond à 132°. Nous avons obtenu un chiffre analogue. Après avoir fait ingérer 4 grammes de menthol à un chien, les urines furent traitées suivant les indications de M. Bernier (48). Nous avons effectivement séparé deux osazones dont l'une fondait au-dessus de 200° (glucosazone impure) et l'autre à 132-135°.

Neuberg et Neimann (49) attribuent à la glycurossazone le point de fusion 202°. La composition de leur produit a été vérifiée par l'analyse élémentaire. Pensant qu'il s'agissait peut-être d'une différence due à ce que les auteurs allemands se servaient du tube capillaire, nous avons essayé de prendre le point de fusion par cette méthode. Notre osazone s'est décomposée vers 140°.

En résumé le point de fusion des pentosazones les sépare nettement des osazones obtenues à partir des autres sucres rencontrés dans l'urine et même de l'acide glycuronique. Pour les distinguer entre elles, il convient d'employer la méthode de Zerner et Waltuch et les moyens que nous avons indiqués au chapitre précédent. L'examen polarimétrique en solution dans le mélange pyri-

dine-alcool donne également des indications utiles tirées du sens du pouvoir rotatoire et des caractères de la multirotation. En effet, pour les xylosazones, le pouvoir rotatoire stable est plus grand que le pouvoir rotatoire initial. Pour les arabinosazones c'est l'inverse (Levene et La Forge 20). La l-xylosazone est lévogyre, la l-arabinosazone est dextrogyre. Dans le cas où il serait difficile de se prononcer sur le pouvoir rotatoire du sucre lui-même, le pouvoir rotatoire de l'osazone suffirait pour le classer dans la série d ou l.

On peut résumer les résultats précédents par le tableau suivant :

d-arabinosazone	$\left\{ \begin{array}{l} \text{d-arabinose} \\ \text{d-ribose} \\ \text{d-arabocétose} \end{array} \right.$	l-arabinosazone	$\left\{ \begin{array}{l} \text{l-arabinose.} \\ \text{l-ribose.} \\ \text{l-arabocétose} \end{array} \right.$
d-xylosazone	$\left\{ \begin{array}{l} \text{d-xylose} \\ \text{l-lyxose} \\ \text{d-xylocétose} \end{array} \right.$	l-xylosazone	$\left\{ \begin{array}{l} \text{l-xylose} \\ \text{d-lyxose} \\ \text{l-xylocétose.} \end{array} \right.$

L'étude complète d'une osazone restreint donc les possibilités à trois sucres sur douze.

Parabromophénylhydrazones. Les parabromophénylhydrazones permettent de serrer de plus près la solution du problème.

Malheureusement, certaines d'entre elles présentent des propriétés très voisines les unes des autres. Les parabromophénylhydrazones d'un premier groupe fondent vers 160°.

l-arabinose	162	Abderhalden (50)
l-ribose	164-165	Abderhalden (51)
d-lyxose	158	Levene et La Forge(20)

Celles d'un deuxième groupe fondent vers 130° :

l-xylose	128	Abderhalden (52)
d-xylocétose	130-131	Levene et La Forge (20)

A notre connaissance, les parabromophénylhydrazones des arabocétoses n'ont jamais été préparées.

Levene et La Forge (20) ont montré que la méthode de Zerner et Waltuch était applicable aux parabromophénylhydrazones, ce qui permet de distinguer des parabromophénylhydrazones différentes dont le point de fusion est voisin. C'est ainsi que la parabromophénylhydrazone du sucre de leur pentosurique mélangée à celle du l-xylose a déterminé un abaissement du point de fusion à 121-122. Ce seul fait permettait d'éliminer le d-xylose.

Le pouvoir rotatoire des parabromophénylhydrazones n'a pas encore été bien étudié. Cependant le d-lyxose peut se distinguer du l-xylose par le pouvoir rotatoire de leur parabromophénylhydrazone en solution pyridique. La première est dextrogyre, la seconde lévogyre (Levene et La Forge 20).

Diphénylhydrazine. Elle donne une hydrazone qui est spécifique de l'arabinose. Elle a permis à Neuberg (32) et à Cammidge (33) d'isoler le d-l-arabinose de l'urine de quatre pentosuriques. Il est possible, en effet, de régénérer le sucre lui-même à partir de son hydrazone.

Signalons que plusieurs expérimentateurs ont essayé en vain d'obtenir la diphénylhydrazone du pentose en présence duquel ils se trouvaient. Cependant les cas de Klerker (53) et de Elliott et Raper (54) ne paraissent aucunement différents de ceux de Neuberg et Cammidge

(urines inactives). Dans le cas de Luzatto (34), il s'agissait, au contraire, d'un pentose actif.

Diphénylméthane-diphenyl-dihydrazine ou hydrazine de Braun (6). Elle donne avec l'arabinose une hydrazone fondant à 180°, avec le d-ribose, un composé soluble dans l'alcool fondant à 141-142°, avec le d-lyxose une combinaison moins soluble dans l'alcool fondant à 156°. Elle ne réagit ni sur le xylose ni sur les cétooses.

L'absence de réaction sur les cétooses est contestée par Zerner et Waltuch (19) qui ont employé l'hydrazine de Braun pour étudier leurs cas de pentosurie. Il ont obtenu un composé fondant à 171° ce qui leur a permis d'éliminer les riboses et lyxoses. Les caractères de l'osazone étant ceux de la d-xylosazone, les auteurs en ont déduit qu'ils étaient vraisemblablement en présence du d-xylocétose. D'après Zerner et Waltuch, l'hydrazine de Braun réagit sur le lévulose ; il n'est donc pas impossible qu'elle se combine également à un cétopentose.

Aron (55) s'est également servi de l'hydrazine de Braun pour l'étude de son cas de pentosurie. Les résultats, malgré une certaine imprécision, permettent de conclure qu'il était vraisemblablement en présence de d-l-arabinose.

Fermentation. — Les pentoses ne fermentent pas par la levure de bière. Récemment, Castellani et Taylor (56) ont publié une méthode permettant de distinguer les pentoses des autres sucres, en faisant cultiver dans la solution à examiner différents champignons et bactéries.

Résumé. — Si l'on considère séparément les méthodes appliquées à l'identification des pentoses, on se rend compte aisément qu'aucune d'elles, sauf peut-être celle de Neuberg et celle de Braun, ne peut donner d'emblée le résultat cherché. Celui-ci, comme c'est habituel d'ailleurs, ne sera obtenu qu'après avoir mis en œuvre au moins en partie la série des moyens d'investigation que nous venons d'exposer. Il convient auparavant de concentrer les urines par une des méthodes que l'on trouve exposées dans les mémoires de Levene et La Forge (20), A. Hiller (46), Zerner et Waltuch (19).

On peut schématiser l'identification d'un pentose par le tableau suivant.

Réact. de Selivanof nég. Réact. de Pinoff et Gude nég. Oxydation par Br. Aldopentose	Arabinosazone	sucre dextro.	l-arabinose parabromo F. 162
		osazone dex.	l-ribose — F. 164-156
		sucre lévo.	d-arabinose parobromo F. 162
		osazone lévo.	d-ribose — F. 164-165
	Xylosazone	sucre dextro.	l-xylose parabromo F. 123
		osazone lévo.	
		sucre lévo.	d-xylose parabromo F. 123
		osazone dex.	
		sucre d'extro.	l-lyxose parabromo F. 158
		osazone dex.	
		sucre lévo.	d-lyxose parabromo F. 158
		osazone lévo.	

Réact. de Selivanof positive.	d arabinosazone lévo.	d-arabocétose
Réact. de Pînoff et gude positive.	l-arabinosazone dextro.	l-arabocétose
Sucre peu oxydable par Br.	d-xylosazone dextro.	d-xylocétose (sucre dextrogyre)
<i>Cétopentose</i>	l-xylosazone lévo.	l xylocétose (sucre lévogyre)

L'examen du précédent tableau montre que la distinction des arabinoses et des riboses ne peut se faire que par la méthode de Zerner et Waltuch appliquée aux parabromophényl-hydrzones ou bien par les méthodes de Neuberg et de Braun. Le pouvoir rotatoire des parabromophényl-hydrzones en solution pyridique permettrait peut-être d'arriver au même résultat. A notre connaissance, il n'a pas encore été déterminé.

Pentosuries associés. Pentosurie du diabète. — Külz et Vogel (10), W. Voit (11) ont décrit une pentosurie très minime chez les diabétiques. Nous avons déjà dit notre opinion au sujet de leur méthode. K. v. Alftan (57) aurait décelé par un autre moyen les pentoses dans les urines de douze diabétiques ; malheureusement nous n'avons pas pu nous reporter au mémoire original. Jolles (58) prétend caractériser les pentoses dans les urines des diabétiques par le furfurol produit en traitant par l'acide chlorhydrique les urines elles-mêmes ou le précipité d'osazones que l'on peut en obtenir. Beaucoup d'hydrates de carbone, et en particulier l'acide glycuronique, étant plus ou moins facilement générateurs de composés furfuriques sous l'influence des acides minéraux, cette méthode ne nous paraît pas devoir retenir l'attention.

Dans certains cas de pentosurie, d'autres sucres sont associés au sucre en C⁵. Plusieurs auteurs ont signalé la présence du glucose dans les urines des pentosuriques. (Jastrowitz et Salkowski 59, Wrzesnewski 60). Il est évident que dans ce dernier cas les urines sont dextrogyres et fermentescibles. Une partie des pentoses est d'ailleurs détruite par la fermentation. Wrzesnewski a identifié le d-l-arabinose par sa diphénylhydrazone après s'être débarrassé du glucose par fermentation. Dans deux observations de Cammidge, (33) il existait, en plus du glucose, un sucre lévogyre, le pseudo-lévulose (1).

Classification des pentosuries. — La pentosurie alimentaire et la pentosurie du diabète étant mises à part, l'examen des différents cas de pentosurie essentielle montre que la question est plus complexe qu'on ne le croyait autrefois. Nous proposons la classification suivante.

1^o Groupe des pentoses racémiques.

C'est la pentosurie classique, les urines sont inactives sur la lumière polarisée. Elle correspond aux cas de Blumenthal (61), Meyer (62), Bial (63), Tintemann (61), Brat (65), Klerker (53), Aron (55), Elliott et Raper (54), Cammidge (33) (5 cas sur 7), Ed. Justin Mueller (66). Il semble que dans beaucoup d'observations le d-l-arabinose soit en cause, cependant il n'est pas impossible qu'il s'agisse parfois du d-l-ribose. En effet, Klerker d'une part,

(1) Le pseudo-lévulose est un des produits de l'action des alcalis sur le glucose.

Elliott et Raper, d'autre part, n'ont pas pu obtenir de diphénylhydrazone.

2° Groupe du d-xylose.

Il est probable que toutes les observations de ce groupe sont relatives à un seul sucre, le d-xylocétose. Ce dernier a été identifié avec certitude par Levene et La Forge (20) et A. Hiller (46), ainsi qu'avec une très grande vraisemblance, par Zerner et Waltuch (19).

3° Groupe du l-arabinose.

Il correspond aux observations de Schüller (37) urine dextrogyre, réaction de Neumann en violet, Luzatto (34), Rosenfeld (35), Blumenthal (36) (urines dextrogyres, osazone dextrogyre). Il se pourrait que les observations de ce groupe appartiennent, en réalité, au précédent, car le d-xylocétose et son osazone sont dextrogyres. D'autre part, les cas en question sont tous anciens et ont été incomplètement étudiés.

4° Pentosuries associées.

CHAPITRE IV.

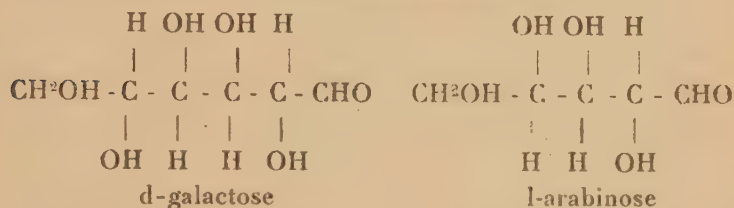
Physiologie pathologique de la pentosurie

La question de la pentosurie est quelque peu délaissée aujourd'hui. Elle vaudrait cependant la peine d'être étudiée avec soin. Sa solution apporterait peut-être à certains problèmes du métabolisme des éclaircissements inattendus. Nous nous efforcerons, dans ce chapitre, de mettre en lumière l'intérêt que pourrait présenter pour la physiologie et la pathologie générale une connaissance plus approfondie de cette curieuse anomalie des échanges nutritifs.

Tous les auteurs qui ont eu l'occasion d'observer avec soin des pentosuriques ont noté l'indépendance complète du taux des pentoses urinaires vis-à-vis des hydrates de carbone alimentaires. Le jeûne hydrocarboné ne diminue pas la teneur des urines en pentoses. Chose curieuse les pentosuriques semblent utiliser les pentoses ingérés aussi bien que les individus normaux (Bial et Blumenthal 67, Tintemann (64). D'après les expériences de Bial et Blumenthal (67), de Tintemann (64), de Cammidge (33), il en serait de même pour le lactose et le galactose. Seul Luzatto (68) prétend avoir vu augmenter la pentosurie après l'ingestion de galactose.

L'intérêt que présenterait l'augmentation du pentose urinaire sous l'influence du galactose est en rapport avec

une hypothèse formulée par Neuberg (69) et qui explique la formation de l'arabinose à partir du galactose. L'organisme étant capable de faire la synthèse du galactose (la lactation en est la preuve), cette suggestion est intéressante. Du point de vue stéréochimique, il existe une certaine parenté entre l'arabinose et le galactose.



Cette hypothèse ne repose, à l'heure actuelle, sur aucune base expérimentale suffisante.

Il est tout à fait impossible d'expliquer la pentosurie par la dégradation des nucléines de l'organisme. Grund (70) a, en effet, calculé que la totalité des pentoses du corps humain représente à peine ce qu'un pentosurique élimine quelquefois en un jour. A fortiori, on comprend qu'une alimentation même très riche en nucléoprotéides n'ait pas pu augmenter le taux des pentoses urinaires (Bial et Blumenthal 67).

Beaucoup plus intéressante est l'hypothèse qui voit dans les protéines alimentaires la source du pentose urinaire.

Klerker (53) a eu le mérite de montrer le parallélisme qui existe entre l'excrétion de l'azote et celle des pentoses. Le taux des pentoses urinaires varie au cours de la journée, ses variations suivent celles de l'azote. La suppression des protéines de l'alimentation fait baisser considérablement la pentosurie.

Cambridge (33) a repris les expériences de Klerker et a observé que la quantité de pentose excrétée en 24 heures passait de 3 gr. 2 à 0 gr. 50 lorsque la ration était pauvre en protéines. Le pentose est revenu à son taux normal avec la reprise de l'alimentation mixte ordinaire. Cambridge a, de plus, noté, chez ses pentosuriques, l'excrétion d'une quantité anormalement élevée d'acides aminés. Il conclut que la pentosurie est le témoin de l'imparfait métabolisme d'un pentose d'origine protéique.

Ces observations se trouvent interprétées d'une façon assez satisfaisante par ce que l'on sait aujourd'hui du métabolisme des acides animés. La synthèse du glucose dans l'organisme à partir de ces corps est un fait bien établi. Des expériences effectuées sur des chiens dépancratés ou phlorizinés ont montré que les aminoacides aux dépens desquels se fait cette synthèse sont : le glycocolle, l'alanine, la sérine, la cystine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la proline (Lambling 71). On sait peu de chose sur le mécanisme biochimique de cette synthèse. La première opération est certainement la désamination ; c'est la seule qui soit bien connue. Les autres étapes sont du domaine de l'hypothèse. Ces étapes sont, d'ailleurs, certainement différentes suivant l'acide aminé considéré. Il est possible que certains de ces corps générateurs de glucose dans l'organisme normal soient générateurs de pentose dans l'organisme des pentosuriques. Il n'est pas invraisemblable que la synthèse du glucose passe dans certains cas par le stade pentose chez l'homme normal, la pentosurie serait alors le témoin d'une incapacité de parfaire cette synthèse. Il serait intéressant d'étudier les variations du taux du

pentose urinaire chez un pentosurique auquel on ferait ingérer successivement tous les amino-acides producteurs de sucre. On trouverait peut-être ainsi la solution du problème de la pentosurie, peut-être même pourrait-on éclaircir l'intéressante question de la synthèse normale du glucose à partir des amino-acides.

CONCLUSIONS

1°. — L'examen microscopique permet de distinguer assez facilement l'arabinosazone de la xylosazone, même dans le cas, où elles cristallisent de solutions étendues. Par contre, il est possible de les confondre avec la glycurosazone. Les cristaux d'arabinosazone, obtenus à partir d'une solution dans le mélange acétone-benzène, sont différents de ceux de la xylosazone. L'aspect cristallin de la lactosazone nous a semblé remarquablement constant, quelles que soient les conditions de concentration.

2°. — Les expériences de Külz et Vogel, de W. Voit, de Jolles, sont insuffisantes pour démontrer l'existence de petites quantités de pentoses dans les urines des diabétiques.

Il est possible de séparer la xylosazone de la glucosazone par l'acétone étendue de son volume d'eau, mais cette méthode ne donne de bons résultats que s'il existe au moins une partie de xylose pour dix de glucose. Elle n'est pas applicable à la recherche des pentoses dans les urines des diabétiques.

3°. — La lactosazone présente un point de fusion peu net vers 200° ; c'est pourquoi il est préférable, selon nous, de rechercher le point de fusion de son anhydride. Pour cela, il suffit de soumettre la lactosazone à l'action de la chaleur à 160°, pendant une demi-heure.

La lactosazone est transformée en son anhydride fondant à 224-226°. Cette propriété peut servir à la caractérisation du lactose dans l'urine.

4°. — L'arabinosazone, purifiée par plusieurs cristallisations dans l'eau et desséchée dans le vide en présence d'acide sulfurique, fond à 143°. Desséchée à l'étuve ou cristallisée dans le mélange acétone-benzène, elle fond à 169-170°. L'analyse élémentaire du corps fondant à cette température a montré qu'il s'agissait bien de l'arabinosazone elle-même et non d'un anhydride. Le point de fusion de la xylosazone, varie très peu avec les conditions de purification et de dessiccation. L'arabinosazone, comme la xylosazone, fondent vers 160° au tube capillaire. Ces notions peuvent être appliquées au diagnostic de la pentosurie et à l'identification du pentose urinaire.

5°. — La réaction colorée des pentoses qui nous paraît la plus recommandable est la réaction de l'orcine, suivant la technique de Neumann.

6°. — Les méthodes qui nous semblent nécessaires et suffisantes, pour l'identification des pentoses dans l'urine, sont les suivantes ; détermination du pouvoir rotatoire de l'urine ; étude complète de l'osazone (aspect cristallin, variation du point de fusion suivant la méthode de Zerner et Waltuch et celle que nous avons décrite, pouvoir rotatoire en solution pyridine-alcool) étude complète de la parobromophénylhydrazone ; oxydation par le brome.

7°. — Après avoir examiné la plupart des observations de pentosurie essentielle publiées, nous proposons la classification suivante :

a) Groupe des pentoses racémiques (d-l-arabinose et peut-être d-l-ribose).

b) Groupe du d-xylose (il est probable que le d-xylo-cétose en est le seul représentant).

c) Groupe du l-arabinose (il se ramène peut-être au groupe précédent).

d) Pentosuries associées.

8°. — La pentosurie essentielle semble être la manifestation d'une anomalie de la synthèse du glucose à partir de certains acides animés.

Vu : *Le Doyen,*

H. ROGER.

Vu : *Le Président :*

DESGREZ.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. APPEL

Bibliographie

Principales abréviations utilisées :

Ber. : Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.

Z. ph. Ch. : Zeitschrift für physiologische Chemie.

B. k. W. : Berliner klinische Wochenschrift.

J. B. C. : Journal of biological chemistry.

- (1) L. MAQUENNE. — Les sucres et leurs principaux dérivés, Paris, 1900, p. 257.
- (2) E. FISCHER et PILOTY. — Ber., 1891, 24, p. 4214.
- (3) A. RECLAIRE. — Ber., 1908, 41, p. 3665.
- (4) C. A. LOBRY de BRUYN et A. van ECKENSTEIN. — Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas, 1896, 15, p. 97 et 225.
- (5) E. FISCHER. — Ber., 1890, 23, p. 799.
- (6) J. v. BRAUN. — Ber., 1913, 46, p. 3949.
- (7) A. HILGER et S. ROTHENFUSSER. — Ber., 1902, 35, p. 4444.
- (8) MICHAELIS. — Ber., 1893, 26, p. 2190.
- (9) BERNIER. — Thèse de pharmacie, Paris 1909-10 p. 36 et 45.
- (10) E. KÜLZ et J. VOGEL. — Zeitschrift für Biologie, 1895, 32, p. 185.
- (11) W. VOIT. — Zeitschrift für physikalische und diätetische Therapie, 1909, 12, p. 659.
- (12) E. BENDIX. — Die Pentosurie, Stuttgart, 1903, p. 55
- (13) H. BIERRY. — Thèse de sciences naturelles, Paris, 1911, p. 79.
- (14) G. BERTRAND. — Thèse de pharmacie, Paris 1894, p. 27.

- (15) H. BIERRY. — Comptes rendus de la Soc. de biol. 25
avril 1903.
- (16) C. NEUBERG. — Z. ph. Ch., 1900, 29, p. 274.
- (17) C. NEUBERG. — Ber., 1899, 32, p. 3384.
- (18) P. LEVENE et F. B. LA FORGE, J.B.C., 1915, 20, p. 429,
- (19) E. ZERNER et R. WALTUCH. — Monatshefte fur Chem-
mie, 1913, 34, p. 1639 et 1914, 35, p. 1025, Chemis-
ches Centralblatt 1914, 1, p. 804 et 1915, 1, p. 389.
- (20) P. LEVENE et F. B. LA FORGE. — J. B. C., 1914, 18.
p. 319.
- (21) E. FISCHER. — Ber., 1908, 41, p. 73.
- (22) LE GOFF. — Comptes rendus de l'Acad. des Sc., 1898,
127, p. 819.
- (23) G. BERTRAND et P. THOMAS. — Manipulations de chi-
mie biologique, Paris, 1919, p. 456.
- (24) E. FISCHER. — Ber., 1887, 20, p. 827.
- (25) GUIARD et GRIMBERT. — Précis de diagnostic Paris,
1922, p. 882.
- (26) E. FISCHER. — Ber., 1890, 23, p. 2119.
- (27) WOHL. — Ber., 1893, 26, p. 735.
- (28) J. H. WHEELER et B. TOLLENS. — Liebig's Annalen
der Chemie, 254, p. 304.
- (29) A. GILBERT et BAUDOUIN. — Journal de physiologie et
de pathologie générale, 1911, p. 607.
- (30) FLÜCKIGER. — Z. ph. Ch., 1885, 9, p. 323.
- (31) P. MAYER et C. NEUBERG. — Z. ph. Ch., 1900, 29, p. 267.
- (32) C. NEUBERG. — Ber., 1900, 33, p. 2243.
- (33) S. J. CAMMIDGE et HOWARD. — British medical journal,
1920, 2, p. 777.
- (34) R. LUZATTO. — Beiträge zur chemischen Physiologie
und Pathologie. (Hofmeister's Beiträge), 1905, 6, p. 87.
- (35) F. ROSENFELD. — Medizinische Klinik, 1906, 2 p. 1041.
- (36) F. BLUMENTHAL. — cité d'après Rosenfeld, loc. cit.

- (37) L. SCHÜLER. — B. k. W., 1910, p. 1322.
- (38) O. et R. ADLER. — Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere (Pflüger's Archiv), 1905, 110, p. 625.
- (39) BLUM. — Zeitschrift für klinische Medizin, 1906, 59, p. 244.
- (40) NEUMANN. — B. k. W., 1904, p. 1073.
- (41) P. THOMAS. — Bulletin de la soc. de chimie biol. fév. 1925.
- (42) P. LEVENE et F. B. LA FORGE. — J. B. C., 1913, 15, p. 481.
- (43) C. NEUBERG. — Z. ph. Ch., 1900, 31, p. 571.
- (44) H. et A. EULER. — Ber., 1906, 39, p. 47.
- (45) PINOFF et GUDE. — Chemiker Zeitung, 1914. n° 59, p. 625.
- (46) A. HILLER. — J. B. C., 30, 1917, p. 127.
- (47) E. FISCHER. — Ber., 1894, 27, p. 2487 et 2491.
- (48) BERNIER. — Journal de pharmacie et de chimie, 7^e série, 1910, 2 p. 406.
- (49) C. NEUBERG et W. Neimann. — Z. ph. Ch., 1905, 44, p. 111.
- (50) ABDERHALDEN. — Biochemisches Handlexikon, 2, p. 287.
- (51) ABDERHALDEN. — id id 2, p. 299.
- (52) ABDERHALDEN. — id id 2, p. 296.
- (53) K. O. KLERKER. — id Nordiskt medicinskt Arkiv, (Stockholm). 1905, Abt. 2, p. 1 et 53 (article en allemand).
- (54) G. H. ELLIOTT et H. S. RAPER. — J. B. C. 1912, 11, p. 211.
- (55) ARON. — cité d'après Zerner et Waltuch, Biochemische Zeitschrift, 1913, 58, p. 410.
- (56) A. CASTELLANI et F. E. TAYLOR. — Lancet, 1920, 1, p. 847.

- (57) K. v. ALFTHAN. — cité d'après W. Voit (11).
 - (58) A. JOLLES. — Zeitschrift für analytische Chemie, 1907, 46, p. 764 Centralblatt für innere Medizin n° 28. 1912.
 - (59) M. JASTROWITZ et E. SALKOWSKI. — Centralblatt für die medizinische Wissenschaft., 1892, n° 19.
 - (60) A. N. WRZESNEWSKI. — Biochemische Zeitschrift. 1922, 132, p. 135.
 - (61) F. BLUMENTHAL. — B. k. W., 1895, n° 26 p. 567.
 - (62) MEYER. — B. k. W., 1901, n° 30 p. 785.
 - (63) BIAL. — Zeitschrift für klinische Medizin, 1900, 39, p. 473.
 - (64) TINTEMANN. — Zeitschrift für klinische Medizin, 1906, 58, p. 190.
 - (65) BRAT. — Zeitschrift für klinische Medizin, 1902, 47, p. 499.
 - (66) Ed. JUSTIN-MUELLER. — Journal de pharmacie et de chimie 7^e série, 23, p. 317.
 - (67) M. BIAL et F. BLUMENTHAL. — Deutsche medizinische Wochenschrift, 1901, 27, p. 349.
 - (68) R. LUZATTO. — Archiv für experimentelle Path. u. Pharm. 1908, supp., p. 374.
 - (69) C. NEUBERG. — Ergebnisse der Physiologie, 1904, 3, p. 428.
 - (70) GRUND. — Z. ph. Ch. 1902, 35, p. 111.
 - (71) E. LAMBLING. — Précis de biochimie. Paris 1919 p. 388.
-

